

マウス知覚神経における接着分子—上皮型カドヘリン—の 発現：特に軸索束形成における役割について

金沢大学医学部脳神経外科学講座（主任：山下純宏教授）

内 山 尚 之

（平成5年1月6日受付）

本研究の目的は、マウス脊髄神経におけるE型カドヘリンの局在を決定し、この接着分子が神経回路網の形成にどのような役割を果たしているかを明らかにすることである。生後2日から52日までのマウスの脊髄神経節、後根、前根そして脊髄におけるE型カドヘリンの発現をビブラトーム切片を用いた免疫電子顕微鏡法（pre-embedding method）によって観察した。後根および脊髄 Rexed の第Ⅱ層内で、E型カドヘリンは一部の軸索束を形成した無髄神経線維の軸索膜に発現していた。有髄神経の軸索膜、また第Ⅱ層の神経細胞には発現はみられなかった。脊髄神経節内では、E型カドヘリンはすべての衛星細胞にみられた。前根および後根内のシュワン細胞は、細胞膜表面にE型カドヘリンを発現していた。無髄神経のシュワン細胞と軸索の接着面、および無髄神経線維束を取り囲むシュワン細胞の突起同士の接着面にE型カドヘリンが発現していた。また有髄神経の外軸索間膜、およびランヴィエ絞輪部のシュワン細胞の指状突起と軸索膜間の一部に発現がみられた。以上の結果より、脊髄神経節細胞の一部は、細胞膜そして軸索膜にE型カドヘリンを発現することにより、選択的な軸索束形成を行い、標的細胞に軸索を誘導していると考えられた。また、シュワン細胞および衛星細胞のE型カドヘリンは、末梢神経の構造の維持に関与している可能性があると思われた。

Key words E-cadherin, fasciculation, immunoelectron microscopy, mouse sensory neuron, unmyelinated fiber

神経細胞ならびにその突起である軸索は、数種類の細胞表面蛋白を発現し、神経栄養因子の受容や他の細胞との接着を行うことにより、突起伸展経路を認識していると考えられている¹⁾。細胞表面蛋白のなかで、細胞相互の接着や細胞外マトリックス（extracellular matrix）との接着に関与するものは細胞接着分子（cell adhesion molecule）と呼ばれ、その遺伝子構造および生化学的特徴から、免疫グロブリンスーパーファミリー²⁾、インテグリンスーパーファミリー³⁾、カドヘリンファミリー⁴⁵⁾の三群に大別されている。

カドヘリンはTakeichi⁶⁷⁾によりカルシウム依存性の接着に関わる分子として同定された。その後、発現部位により、上皮型⁸⁾（epithelial, E型）、胎盤型⁹⁾（placental, P型）、神経型¹⁰⁾（neural, N型）などに分類され、それぞれの一次構造¹¹⁾や、発生過程における役割が報告されている。たとえば、E型カドヘリンを発現する胚がP型カドヘリンを発現する子宮に着床する際に、胚の外胚葉性胎盤円錐体に新たにP型カドヘリンが発現することにより両組織は結合し、胎盤が形成される⁹⁾。また、神経管が形成される際において、神経板はE型カドヘリンの発現を停止し表皮から離脱した後、N型カドヘリンを発現して神経管を形成する¹²⁾。このように、カドヘリンの発現の変化が細胞の分離および結合に密接に関係することから、組織の形態形成過程にカドヘリンが重要な役割を果たしているものと考えられている。

カドヘリンファミリーのなかで、神経組織で最初に発見されたものはN型であり、神経組織の形成¹³¹⁴⁾、神経突起の伸展¹⁵¹⁶⁾、神経束の形成²⁰⁾に関与するとされている。近年、脳型²¹⁾（brain, B型）、網膜型²²⁾（retinal, R型）、切断型²³⁾（truncated, T型）といった神経組織内の新たなカドヘリン分子の発見が相次ぎ、さらにポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction）法を用いて、ラット脳内に上記以外に7種類以上のカドヘリンが存在することが報告されている²⁴⁾。これらの多数のカドヘリンの局在および機能はいまだ明らかではないが、それぞれのカドヘリンが、特定の神経回路の形成や、同一機能を有する細胞集団の形成を行うことにより、正しい神経回路網をつくりあげているものと考えられている²⁵²⁶⁾。

E型カドヘリンは主に上皮組織に発現している接着分子であるが、マウスの三叉神経節および脊髄神経節にも発現していることが最近になって明らかになった²⁷⁾。さらに脊髄神経節において、E型カドヘリンを発現しているのは一部の細胞のみであり、この接着分子がある特定の神経回路の形成に関与していることが推察されている²⁸⁾が、その詳細は不明である。

本研究では、ビブラトーム切片を用いた免疫電子顕微鏡（免疫電顕）法（pre-embedding method）によって、脊髄神経節、神経根および脊髄内におけるE型カドヘリンの発現様式を詳細に観察することにより、神経回路網の形成とその維持に対するE

Abbreviations: ABC, avidin-biotin-peroxidase complex; DAB, 3, 3-diaminobenzidine; 光顕, 光学顕微鏡; 電顕, 電子顕微鏡

型カドヘリンの関与について検討することを目的とした。

材料および方法

I. 動物および標本の作製

BALB/c マウス (2, 14, 28, 52 日齢, 雌, それぞれ 3, 6, 6, 6 匹) 合計 21 匹を用いた。5% 抱水クロラル (0.01 ml/g 体重) の腹腔内投与による全身麻酔下に, 2 mM の塩化カルシウム (CaCl₂) を含有した 0.01 M HEPES 緩衝液 (pH 7.4) に 4% パラフォルムアルデヒドを加えた固定液を左心室より注入し, 灌流固定を行った。直ちに手術顕微鏡下に下位胸椎から上位腰椎までの椎弓を切除して脊髄を露出したのち, 同固定液による 12 時間以上の浸漬固定を追加した。光学顕微鏡 (光顕) 的観察用には, 椎体および椎弓根が付着したまま, 脊髄, 脊髄神経節, 後根ならびに前根を一塊として摘出した。電子顕微鏡 (電顕) 的観察用には, 脊髄, 脊髄神経節, 後根ならびに前根をそれぞれ単独に摘出した。全ての摘出標本は, 10, 15, 20% ショ糖を含有する 0.01 M HEPES 緩衝液 (pH 7.4) にそれぞれ 6 時間ずつ浸透した。

II. 抗体

E 型カドヘリンの検出には ECCD-2²⁹ (ラット抗 E 型カドヘリン抗体) を用い, アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC) 法³⁰にて抗原の検出を行った。

III. 免疫組織化学

1. 光顕的観察

2 日齢および 52 日齢マウスの頸髄を対象とした。濾紙にて水分を吸収した後, 組織を O. C. T. compound (マイルズ・三共株式会社, 東京) に包埋し, 液体窒素にて急速に凍結した。クライオスタット (マイルズ・三共株式会社) にて厚さ 4-6 μm に薄切し, ポリ-L-リジン (poly-L-lysine) を塗布したスライドガラス上に貼付した。正常ウサギ血清と反応させることにより, 非特異的反応を阻止した後に, 一次抗体 (500 倍希釈した ECCD-2) と 4℃ で 3 時間反応させた。これを洗浄した後に, 二次抗体としてウサギ-ビオチン化抗ラット抗体 (Vector, Burlingame, 米国) と 1 時間反応させ, さらに ABC (Vector) と 1 時間反応させた。洗浄の後, 0.02% ジアミノベンチジン (3, 3'-diaminobenzidine-4HCl, DAB) と 0.05% 過酸化水素を含む 0.05 M トリス塩酸 (Tris-HCl) 緩衝液 (pH 7.4) と 5 分間反応させ, 光学顕微鏡にて観察した。

2. 電顕的観察

脊髄神経節については 14, 28, 52 日齢を, 前根については 52 日齢を, 後根および脊髄については 2, 14, 28, 52 日齢を対象とした。摘出した組織から, DTK-3000 型マイクロスライサー (堂阪イーエム社, 京都) を用いて厚さ 40-60 μm の切片を作製した。20% ショ糖を含有した 0.01 M HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 内に 1 時間静置した後, 0.1% 正常ウサギ血清と 3 時間反応させた。一次抗体 (500 倍希釈した ECCD-2) と 4℃ で一晩反応させ, 洗浄後二次抗体と 4℃ で 12 時間反応させ, さらに ABC と室温で 6 時間反応させた。0.1% グルタルアルデヒドで再固定をした後, 0.02% DAB を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) に 30 分間, さらに 0.05% 過酸化水素を加えた反応液に 15 分間静置した^{31,32}。実体顕微鏡にて免疫組織反応が陽性であることを確認し, 1% 四酸化オスミウムで後固定を行った後, エタノールで脱水しエポンに包埋した。LKB-2188 型ウルトラト

ム (LKB-Produkter, Bromma, スウェーデン) にて超薄切片を作製し, 無染色または鉛染色後, H-600 型電子顕微鏡 (日立, 東京) にて観察した。

成 績

I. 光顕的観察による E 型カドヘリンの発現

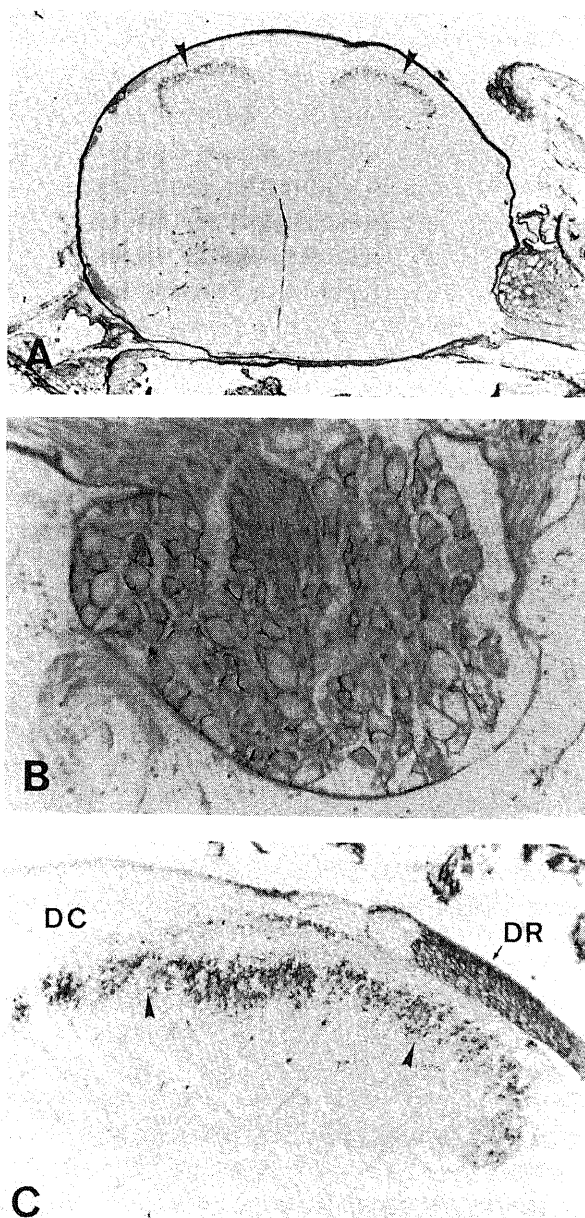


Fig. 1. Immunostaining for E-cadherin on a section of cervical spinal cord of 52-day-old mice. (A) Dorsal root ganglia (DRG), the dorsal and ventral roots, and dura mater stain positively for E-cadherin. Arrowheads indicate E-cadherin-positive areas in the spinal cord. (B) A higher magnification of DRG. The dorsal root ganglion cells stain at the cell-cell boundaries but not in the cytoplasm. (C) A high magnification of the dorsal horn. Arrowheads indicate E-cadherin-positive areas in lamina II. The surface of myelin sheath are E-cadherin-positive in the dorsal root (DR) and negative in the dorsal column (DC). A, $\times 72$. B, C, $\times 360$.

2および52日齢マウスの頸髄において、E型カドヘリンは、脊髄神経節、後根、脊髄第Ⅱ層、前根および硬膜に発現していた(図1-A, B, C)。前角細胞およびその周囲には発現はみられなかった。脊髄神経節では個々の神経節細胞膜に沿って発現していたが、胞体内には発現していなかった。前根、後根においては、末梢性髄鞘の最外層に発現していた。脊髄内では、Rexedの第Ⅱ層³³⁾に局限して発現していた。後根から第Ⅱ層に至る経路では、脊髄後角の表層部に発現がみられた。脊髄内の中枢性髄鞘には発現していなかった。

Ⅱ. 電顕的観察によるE型カドヘリンの発現

1. 脊髄神経節のE型カドヘリンの発現

14, 28, 52日齢いずれのマウスにおいても、脊髄神経節内のすべての衛星細胞が、脊髄神経節細胞との接着面、他の衛星細胞との接着面にE型カドヘリンを発現していた(図2-A, B)。軸索起始部(initial segment)における衛星細胞と軸索との接着面

においても発現がみられた(図2-C)。また衛星細胞の指状の突起にもE型カドヘリンが発現していた(図2-C)。衛星細胞が付着せず、直接神経節細胞の細胞膜が露出した部分は観察できなかった。

2. 後根のE型カドヘリンの発現

1) 2日齢マウス(図3)

E型カドヘリンは軸索束を形成した細い神経線維の軸索膜に発現していた。一方、単独でシュワン細胞に覆われ、将来有髄化すると思われる神経線維の軸索膜には発現していなかった。シュワン細胞は基底膜に面した細胞膜にE型カドヘリンを発現していた。またシュワン細胞と無髄神経線維との接着面の一部にE型カドヘリンが陽性であった。

2) 14日齢マウス

E型カドヘリンは無髄神経線維の一部の軸索膜に発現していた(図4-A, B)。陽性線維は単独では存在せず、数本が集合し、

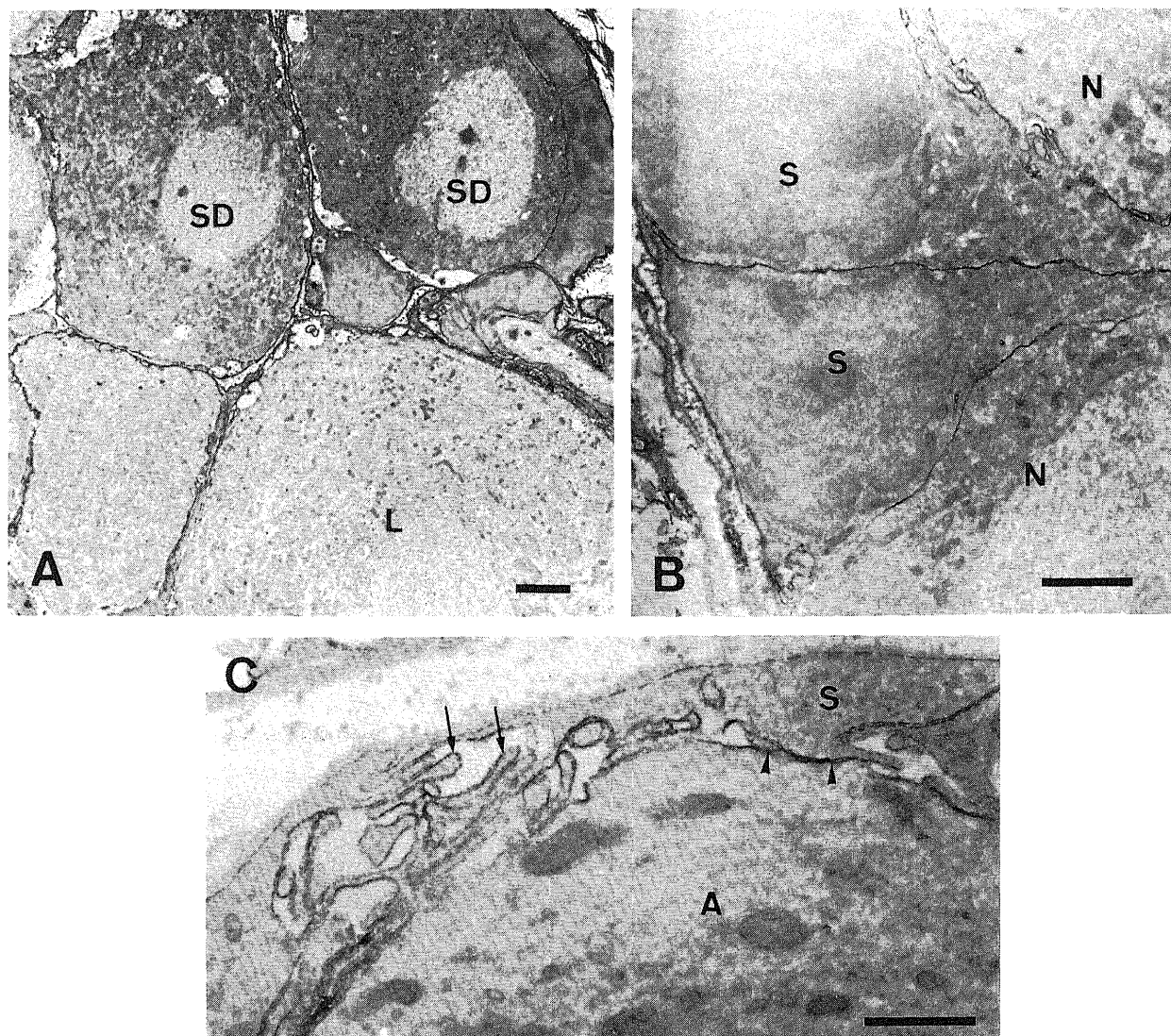


Fig. 2. Immunoelectron microscopic localization of E-cadherin in dorsal root ganglia (DRG) of 28-day-old mice. (A) A survey view of DRG. All satellite cells stain for E-cadherin. Large light neurons (L) and small dark neurons (SD) show the same staining pattern. (B) A high magnification of the satellite cells (S). E-cadherin is seen at contact sites not only between satellite cells but also between satellite cells and neurons (N). E-cadherin is also detectable on membrane of satellite cells at contact sites with basal lamina. (C) A high magnification of the initial segment. Both finger-like processes (arrows) of satellite cells and axolemma of the initial segment (arrowheads) are E-cadherin-positive. A, axon. Bars: A, 4 μ m. B, 2 μ m. C, 1 μ m.

軸索束を形成していた。有髄神経線維の軸索膜と髄鞘の接着面には、E型カドヘリンの発現はみられなかったが、無髄神経線維の軸索膜とシュワン細胞の接着面には、一部発現がみられた。髄鞘形成の有無に関わらずシュワン細胞は、基底膜に面した細胞膜にE型カドヘリンを発現し、無髄神経線維束を覆うシュワン細胞の突起同士が接着する部分でもE型カドヘリンがみられた(図5-A)。有髄神経のランヴィエ絞輪に伸びたシュワン細胞の指状の突起と、それに面する軸索膜はE型カドヘリン陽性であった(図5-B)。今回観察し得た後根内の全軸索のうち、E型カドヘリンが陽性であったものは40%であり、それらは全て無髄神経線維であった(表1)。

3) 28および52日齢マウス

14日齢マウスと比較して軸鞘形成はさらに進み、髄鞘の厚さは28日齢で最大 $0.9\mu\text{m}$ に、52日齢で最大 $1.2\mu\text{m}$ に達していた。無髄神経は軸索束を保っており、シュワン細胞の突起が個々の神経線維を隔てるような所見はみられなかった。有髄および無髄神経ともにE型カドヘリンの発現様式は14日齢マウスとほぼ同様であった。

3. 脊髄後角

2, 14, 28, 52日齢のいずれのマウスにおいても、第Ⅱ層の一部の無髄神経軸索膜にE型カドヘリンが発現していた(図6-A, B)。後根内と同様に、E型カドヘリン陽性線維は一本単独でみられることはなく、必ず軸索束を形成していた。ただしE型カドヘリンを発現していない軸索束もみられた。第Ⅱ層の神経細胞体膜にはE型カドヘリンは発現していなかった。軸索膜が陽性であるものも、連続するシナプス前細胞膜にはE型カド

ヘリンの発現はみられず、これに連結したシナプス後膜にも発現していなかった(図6-B, 挿入図)。

4. 前根

今回観察した成熟マウス頸髄の前根内には無髄神経をみることはできなかった。後根内と同様に、シュワン細胞は、基底膜に面した細胞膜にE型カドヘリンを発現し、軸索に面した細胞膜には発現していなかった。一部の外軸索間膜(outermesaxon)にE型カドヘリンが発現していた(図7)。

考 察

神経回路網の形成過程において、神経細胞の成長円錐は先に伸展した特定の軸索に軸索に親和性を示し、それに沿って進んでゆくことにより軸索の経路を決定する³⁰⁾。これまで、カルシウム非依存性の接着機構を有する免疫グロブリンスーパーファミリーの一員であるL1³⁰⁾, F11³⁰⁾, neurofascin³⁰⁾などの接着分子が、この軸索に沿った成長円錐の伸展に関わっていることが明らかにされている³⁰⁾。複雑な神経回路網を正しく構築するためには、それぞれの神経回路に特異的な軸索伸展の機構が存在し、上記以外にも多くの接着分子が関与していると考えられてきた³¹⁾。カドヘリンは、カルシウムイオンの存在下でのみ接着能を有する接着分子であり、神経系にはN型を始め十数種類のカドヘリンが存在することが報告されている^{21)~24)26)}。カドヘリンは同分子間結合(homophilic binding)を行う接着分子で、同じ型のカドヘリンをもつ細胞は互いに結合し集塊を形成するが、異なった型をもつ細胞では結合せず分離してしまうという性質がみられる。各々のカドヘリンが、この性質によって特定の軸索のみを選択的に集め軸索束を形成していることが推定されている²⁹⁾。

脊髄後角内において、神経伝達物質であるサブスタンスPはRexedの第Ⅰ層と第Ⅱ層に、ソマトスタチンは主に第Ⅱ層に存在する³⁰⁾ことから、両者とE型カドヘリンの発現部位を二重染色法を用いて比較することにより、E型カドヘリンは第Ⅱ層に発現していることが最近報告された²⁰⁾。脊髄神経節由来の神経線維は、脊髄の第Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ, Ⅵ, Ⅷ, Ⅷ層に広く終わる⁴⁰⁾が、E型カドヘリンがこのうちの第Ⅱ層に局限して発現していることより、特定の神経線維のみがE型カドヘリンを発現していると考えられている。しかしこれまでの光顕的観察に基づく報告では、こういった種類の神経線維がE型カドヘリンを発現しているかは不明であった。本研究の免疫電顕法による観察で、E型カドヘリンは後根および脊髄第Ⅱ層内の無髄神経線維にのみ発現していることが確認された。さらに無髄神経線維のなかでもE型カドヘリンを発現しているものは約半数であり、より限られた無髄神経線維のみがE型カドヘリンを発現していることが明らかになった。脊髄第Ⅱ層には、末梢の痛覚受容器、温度覚受容器ならびに機械刺激受容器からの無髄神経線維が終わる⁴¹⁾ことが知られており、E型カドヘリンは、これらの機能を有する脊髄神経節細胞の集団が発現しているものと思われた。

本研究で観察されたE型カドヘリン陽性の無髄神経線維は、単独でみられることはなく、必ず複数が集合し軸索束を形成していた。これまでに軸索束形成への関与が明らかにされている接着分子のひとつであるL1³⁵⁾³⁸⁾の生体内における発現様式を、免疫電顕法によって観察した報告がある。マウス坐骨神経⁴²⁾および視神経⁴³⁾、またラットの錐体路⁴⁴⁾⁴⁵⁾において、L1はすべて

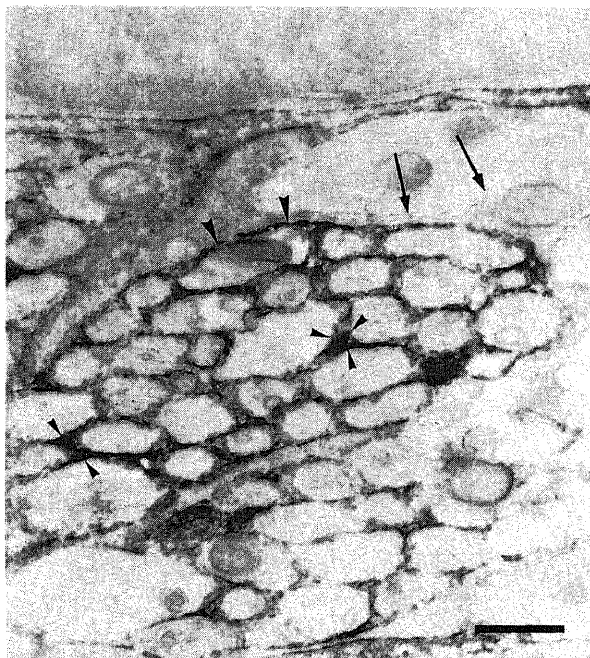


Fig. 3. Immunoelectron microscopic localization of E-cadherin in dorsal roots of 2-day-old mice. Note the peroxidase reaction product on fasciculated fine axons (small arrowheads). The membrane of Schwann cells enclosing fasciculated axons are E-cadherin-positive not only at contact sites with basal lamina, but also with axons (large arrowheads). Contact sites between large "promyelin" axons and Schwann cells enclosing them are E-cadherin-negative (arrows). Bar, $0.5\mu\text{m}$.

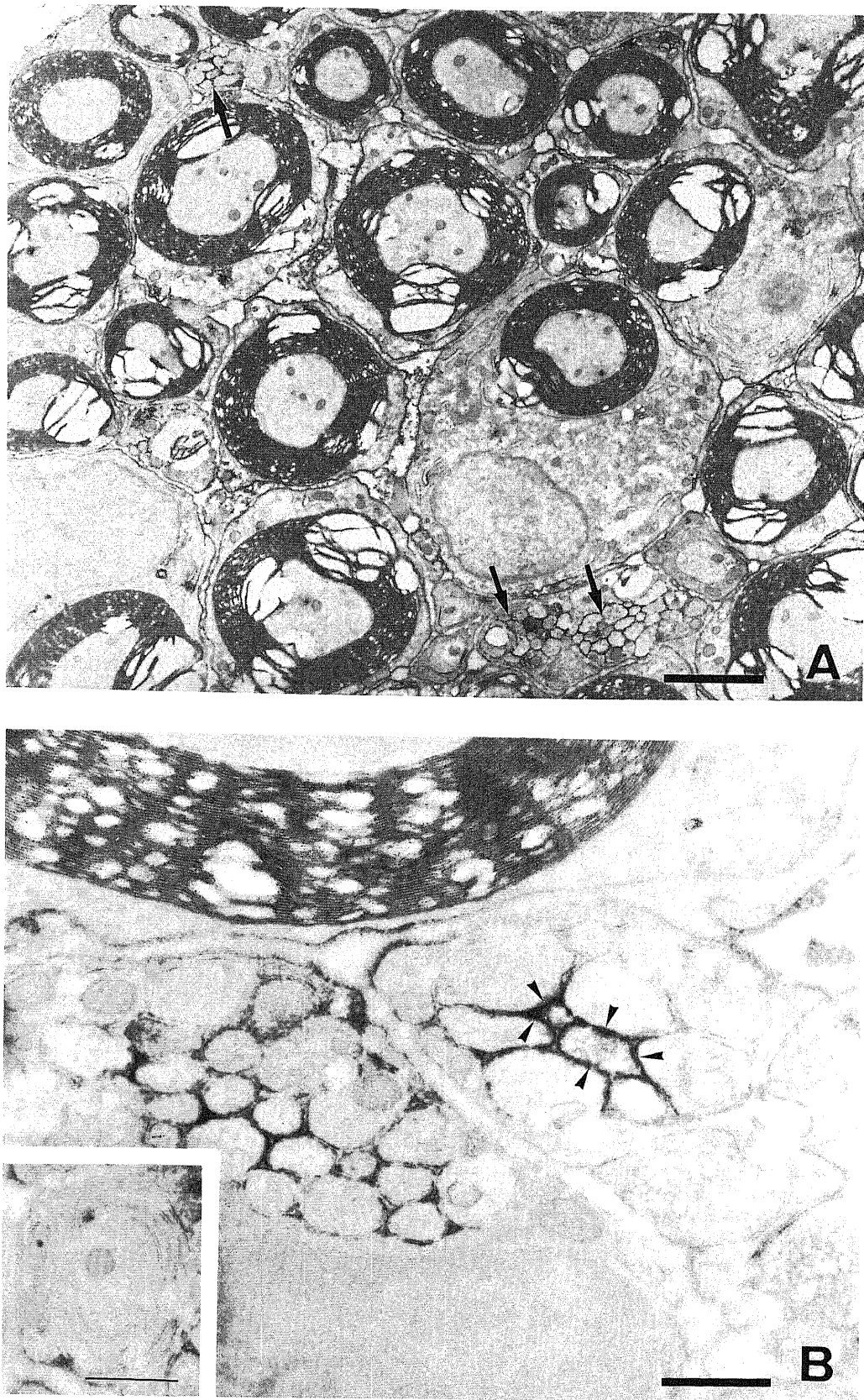


Fig. 4. Immunoelectron microscopic localization of E-cadherin in dorsal roots of 14-day-old mice. (A) Note the peroxidase reaction product on membrane of myelinating Schwann cells at contact sites with basal lamina. E-cadherin is seen neither between axolemma and compact myelin nor in compact myelin. Several fasciculated axons are E-cadherin-positive at contact sites with each other (arrow). (B) A high magnification of unmyelinated fibers. E-cadherin is seen on some fasciculated axons at contact sites with each other (arrowheads). (Inset) A large axon surrounded by double Schwann cell loops. Neither axon nor Schwann cell is stained for E-cadherin. Bars: A, 2 μ m. B, C, 0.5 μ m.

の無髄神経線維間に発現していることから、この接着分子は無髄神経線維全般の軸索束形成に関与していると考えられている。一方、E型カドヘリン陽性線維は後根内の全無髄神経線維の約半数であった。後根内の神経線維は、同じ知覚伝達機能を有する線維同士が集合してひとつの軸索束を形成し、異なる知覚伝達機能を有する神経線維束とは混合しないとされる⁴⁶⁾。このような機能選択的な軸索束の形成に、E型カドヘリンが関与

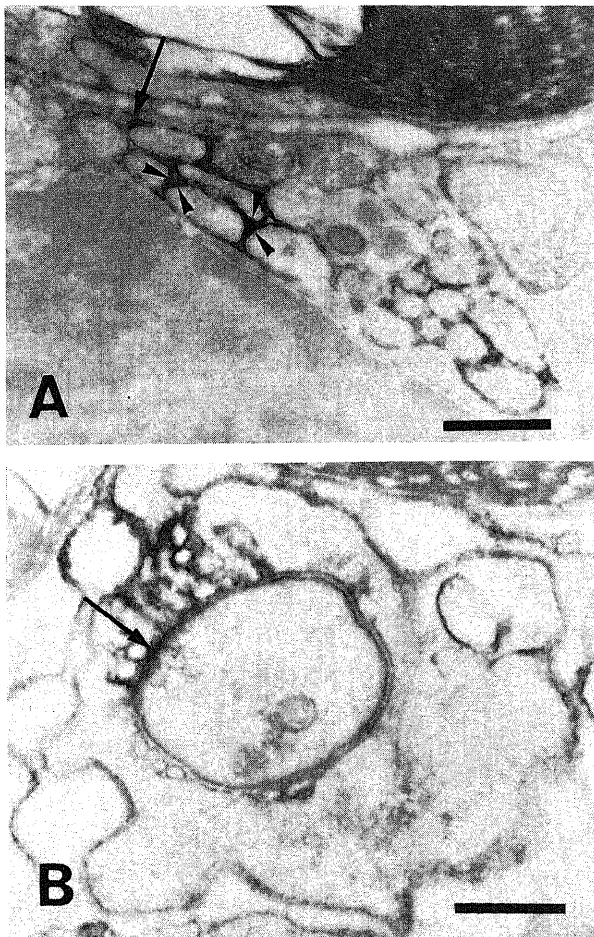


Fig. 5. Immunoelectron microscopic localization of E-cadherin in dorsal roots of 14-day-old mice. (A) Several fasciculated axons are E-cadherin-positive at contact sites with each other (arrowheads). Note the peroxidase reaction product between processes of Schwann cell enclosing fasciculated axons (arrow). (B) E-cadherin is seen at contact sites between finger-like processes of Schwann cells and nodal axolemma (arrow). Bars: A, B, 0.5 μ m.

していることが示唆された。

本研究の免疫電顕法による観察では、第Ⅱ層の神経細胞にはE型カドヘリンを発現しているものはみられなかった。これは、インサイチュハイブリダイゼーション (in situ hybridization) 法を用いた検索により、脊髄内にE型カドヘリンのmRNAを発現している細胞はみられないことから、E型カドヘリンを発現しているのは、一次感覚神経線維のみであり、第Ⅱ層の神経細胞は発現していないとする報告²⁸⁾と一致する。また第Ⅱ層内で観察されたE型カドヘリン陽性の無髄神経線維も、二次感覚神経細胞と接するシナプス膜にはE型カドヘリンを発現していなかった。よって一部の脊髄神経節細胞はE型カドヘリンを発現して選択的な軸索束形成を行うが、最終的な二次神経細胞との接着にはE型カドヘリンを用いていないと考えられ、両者の接着には、E型以外のカドヘリン、もしくはカドヘリンファミリー以外の接着分子が関与していると思われる。

末梢性髄鞘の形成過程には、いくつかの接着分子が関与している。たとえば、シュワン細胞は細胞膜表面にL1⁴⁷⁾およびN型カドヘリン¹²⁾を発現している。それぞれの阻害抗体の存在下では、神経突起とシュワン細胞の接着が阻害されることより、両者は髄鞘形成の初期過程に関与していると考えられている¹⁸⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾。髄鞘形成が始まると、軸索とシュワン細胞のL1は徐々に消失し、代わりに免疫グロブリンスーパーファミリーの一員である髄鞘関連糖蛋白 (myelin-associated glycoprotein) が出現し⁴²⁾、軸索とシュワン細胞の接着を安定化させる。さらに軸索を何重にも取り巻いたシュワン細胞の突起が、自己の細胞膜同士を接着させる段階 (compaction) になると、免疫グロブリンスーパーファミリーの一員であるPoが出現し⁴²⁾、髄鞘の構造維持を行う⁵⁰⁾。本研究では、すべてのシュワン細胞の基底膜に面した側の細胞膜にE型カドヘリンが発現していたが、有髄神経の場合、軸索膜と髄鞘の間には発現はみられなかった。しかし、軸索膜-髄鞘間の接着分子を免疫電顕により同定するには、抗体の浸透の点から、ビブラトーム切片を用いた免疫電顕法は適さず、超薄切片を用いた方法 (post-embedding method) が有効であるとする報告⁴²⁾もあり、同部位におけるE型カドヘリンの有無については、さらなる検討が必要である。一方、無髄神経では軸索とシュワン細胞の接着面と、軸索束を取り囲むシュワン細胞の突起同士が接着する部位にE型カドヘリンが発現していた。また、有髄神経であっても、シュワン細胞の外軸索間膜と、ランヴィエ絞輪のシュワン細胞の指状の突起とそれに面する軸索膜はE型カドヘリン陽性であった。さらにシュワン細胞と同様に末梢性のグリア細胞である衛星細胞も、他の衛星細胞また神経節細胞との接着面にE型カドヘリンを発現していた。以上より、末梢神経の形態の維持にE型カドヘリンが関与している可能性があると思われる。

Table 1. The ratio of E-cadherin-positive fibers in dorsal root of a 14-day-old mouse

| | E-cadherin-positive fibers | Total fibers counted | Ratio (%) |
|---------------------|----------------------------|----------------------|-----------|
| Myelinated fibers | 0 * | 135 | 0.0 |
| Unmyelinated fibers | 256 | 502 | 51.0 |
| Total | 256 | 637 | 40.2 |

* except for nodal axolemma

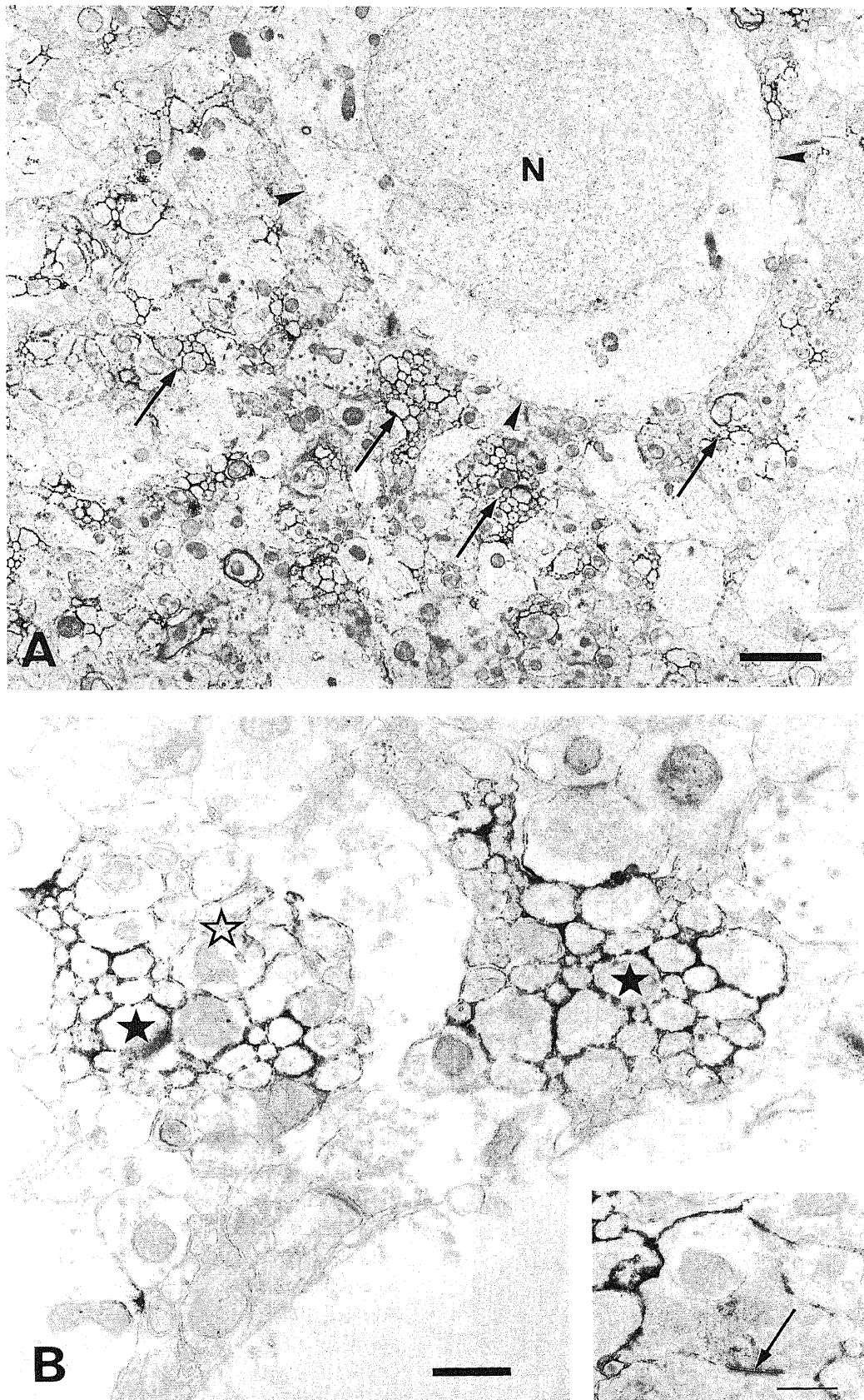


Fig. 6. Immunoelectron microscopic localization of E-cadherin in lamina II of 52-day-old mice. (A) Several fasciculated axons are E-cadherin-positive (arrows). The neurons (N) in lamina II are E-cadherin-negative (arrowheads). (B) A higher magnification of bundles of unmyelinated fibers in figure 6-A. Black asterisks indicate the bundle of E-cadherin-positive fibers. White asterisk indicates the bundle of E-cadherin-negative fibers. (inset) Axolemma of terminal bouton is E-cadherin-positive except for presynaptic membrane (arrow). Bars: A, 1 μ m. B, C, 0.5 μ m.

本研究では、後根および脊髄第Ⅱ層内の一部の無髄神経線維がE型カドヘリンを発現することにより、選択的な軸索束の形成を行っていることが示唆されたが、E型カドヘリンを発現していない他の神経線維が、どのような接着分子によって軸索束形成を行っているかは現在のところ不明である。ニワトリの脊髄神経節には、N型とR型カドヘリンを発現する神経細胞が存在することが報告されており⁵⁾、マウスの脊髄神経節内にも他の型のカドヘリンを発現する神経細胞が存在するものと思われる。これらの神経細胞からの線維が、E型カドヘリン陽性の軸索束とは異なる軸索束を形成していることが確認できれば、カドヘリンによる神経回路網の形成機構がより明らかになるとと思われる。

結 論

マウス脊髄神経節、後根、前根および脊髄におけるE型カドヘリンの発現を、光顕的および電顕的に観察し、神経回路の形成や髄鞘形成における役割を検討した。

1. 後根および脊髄第Ⅱ層内の一部の無髄神経線維の軸索膜にE型カドヘリンの発現がみられた。

2. E型カドヘリン陽性の無髄神経線維は単独でみられることはなく、必ず複数が集まって軸索束を形成していた。

3. 脊髄第Ⅱ層の神経細胞はE型カドヘリンを発現していなかった。同部位のE型カドヘリン陽性線維もそのシナプス膜には、発現がみられなかった。

4. 脊髄神経節内ではE型カドヘリンはすべての衛星細胞にみられ、衛星細胞同士の接着面、また脊髄神経節細胞との接着面に発現していた。

5. シュワン細胞は、基底膜に面した細胞膜表面にE型カドヘリンを発現していた。また有髄神経の外軸索間膜、ランヴィエ絞輪部の指状の突起と軸索膜の間に発現がみられた。無髄神経の軸索とシュワン細胞との接着面、ならびに無髄神経線維束

を取り囲むシュワン細胞の突起同士の接着面にも発現がみられた。

以上の結果より、脊髄神経節細胞の一部が、細胞膜そして軸索膜にE型カドヘリンを発現することにより、選択的な神経線維束形成を行っており、またシュワン細胞および衛星細胞はE型カドヘリンによって、末梢神経の構造の維持を行っていると考えられる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました脳神経外科学教室山下純宏教授に深甚の謝意を表します。また、直接御指導を頂きました同教室長谷川光広助手に深謝いたします。更にモノクローナル抗体を提供して下さいとともに、貴重な御助言を頂きました京都大学理学部生物物理学教室竹市雅俊教授および嶋村健児博士に厚く御礼申し上げます。本研究に御協力頂いた脳神経外科学教室の諸先生、電子顕微鏡技術員横田輝一氏ならびに今村明子技官に感謝の意を表します。なお本論文の要旨は、第3回神経の修復と移植のサマースミナー(1992, 岐阜)、神経組織の成長再生移植研究会第7回学術集会(1992, 名古屋)において発表した。

文 献

- 1) Dodd, J. & Jessel, M. J.: Axon guidance and patterning of neuronal projection in vertebrates. *Science*, **242**, 696-699 (1988).
- 2) Edelman, G. M. & Crossin, K. J.: Cell adhesion molecules: Implications for a molecular histology. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 155-190 (1991).
- 3) Reichardt, L. F. & Tomaselli, K. J.: Extracellular matrix molecules and their receptors: Functions in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.*, **14**, 531-570 (1991).
- 4) Takeichi, M.: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, **251**, 1451-1455 (1991).
- 5) Takeichi, M.: Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 237-252 (1990).
- 6) Takeichi, M.: Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell Biol.*, **75**, 464-474 (1977).
- 7) Yoshida, C. & Takeichi, M.: Teratocarcinoma cell adhesion: Identification of a cell surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell*, **28**, 217-224 (1982).
- 8) Yoshida-Noro, C., Suzuki, N. & Takeichi, M.: Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev. Biol.*, **101**, 19-27 (1984).
- 9) Nose, A. & Takeichi, M.: A novel cadherin adhesion molecule: Its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J. Cell Biol.*, **103**, 2649-2658 (1986).
- 10) Hatta, K. & Takeichi, M.: Expression of N-cadherin adhesion molecule associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature*, **320**, 447-449 (1986).
- 11) Takeichi, M.: The cadherins: Cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, **102**, 639-655 (1988).
- 12) Hatta, K., Okada, T. S. & Takeichi, M.: A monoclonal antibody that recognizes the extracellular domain of N-cadherin inhibits cell-cell adhesion and neurite outgrowth. *J. Cell Biol.*, **103**, 1111-1120 (1986).

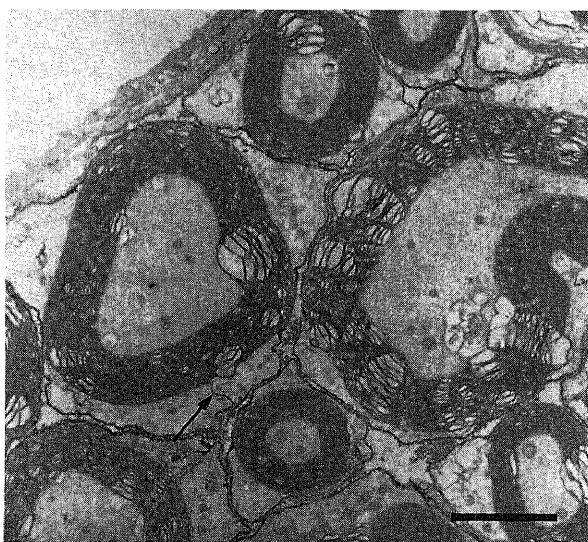


Fig. 7. Immunoelectron microscopic localization of E-cadherin in ventral roots of 52-day-old mice. Cell membranes of Schwann cells are E-cadherin-positive. E-cadherin is seen neither between axolemma and compact myelin nor in compact myelin. Note the peroxidase reaction product on the outer mesaxons (arrow). Bar: 2 μ m.

- lonal antibody disrupting calcium-dependent cell-cell adhesion of brain tissues: Possible role of its target antigen in animal pattern formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2789-2793 (1985).
- 13) Detrick, R. J., Dickey, D. & Kintner, C. R.: The effects of N-cadherin misexpression on morphogenesis in *Xenopus* embryos. *Neuron*, **4**, 493-506 (1990).
 - 14) Fujimori, T., Miyatani, S. & Takeichi, M.: Extopic expression of N-cadherin perturbs histogenesis in *Xenopus* embryos. *Development*, **110**, 97-104 (1990).
 - 15) Matsunaga, M., Hatta, K., Nagafuchi, A. & Takeichi, M.: Guidance of optic nerve fibers by N-cadherin adhesion molecules. *Nature*, **334**, 62-64 (1988).
 - 16) Tomaselli, K. J., Neugebauer, K. M., Bixby, J. L., Lilien, J. & Reichardt, L. F.: N-cadherin and integrins: two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocyte surfaces. *Neuron*, **1**, 33-43 (1988).
 - 17) Bixby, J. L. & Zhang, R.: Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J. Cell Biol.*, **110**, 1253-1260 (1990).
 - 18) Letourneau, P. C., Shattuck, T. A., Roche, F. K., Takeichi, M. & Lemmon, V.: Nerve growth cone migration onto Schwann cells involves the calcium-dependent adhesion molecule, N-cadherin. *Dev. Biol.*, **138**, 430-442 (1990).
 - 19) Doherty, P., Rowett, L. H., Moore, S. E., Mann, D. A. & Walsh, S. W.: Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM and N-cadherin reveals fundamental differences in neuronal responsiveness to CAMs. *Neuron*, **6**, 247-248 (1991).
 - 20) Drazba, J. & Lemmon, V.: The role of cell adhesion molecules in neurite outgrowth on Müller cells. *Dev. Biol.*, **138**, 82-93 (1990).
 - 21) Napolitano, E. W., Venstrom, K., Wheeler, E. F. & Reichardt, L. F.: Molecular cloning and characterization of B-cadherin, a novel chick cadherin. *J. Cell Biol.*, **113**, 893-905 (1991).
 - 22) Inuzuka, H., Miyatani, S. & Takeichi, M.: R-cadherin: A novel Ca^{2+} -dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina. *Neuron*, **7**, 69-79 (1991).
 - 23) Ranscht, B. & Dours-Zimmerman, M. T.: T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron*, **7**, 391-402 (1991).
 - 24) Suzuki, S., Sano, K. & Tanihara, H.: Diversity of the cadherin family: Evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul.*, **2**, 261-270 (1991).
 - 25) Nose, A., Nagafuchi, A. & Takeichi, M.: Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell*, **54**, 993-1001 (1988).
 - 26) Miyatani, S., Shimamura, K., Hatta, M., Nagafuchi, A., Nose, A., Matsunaga, M., Hatta, K. & Takeichi, M.: Neural cadherin: Role in selective cell-cell adhesion. *Science*, **245**, 631-635 (1989).
 - 27) Takeichi, M., Inuzuka, H., Shimamura, K., Fujimori, T. & Nagafuchi, A.: Cadherin subclasses: Differential expression and their roles in neural morphogenesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **55**, 319-325 (1990).
 - 28) Shimamura, K., Takahashi, T. & Takeichi, M.: E-cadherin expression in a particular subset of sensory neurons. *Dev. Biol.*, **152**, 242-254 (1992).
 - 29) Shirayoshi, Y., Nose, A., Iwasaki, K. & Takeichi, M.: N-linked oligosaccharides are not involved in the function of a cell-cell binding glycoprotein E-cadherin. *Cell Struct. Funct.*, **11**, 245-252 (1986).
 - 30) Hsu, S., Raine, L. & Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 577-580 (1981).
 - 31) Nakane, P. K. & Pierce, G. B.: Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J. Cell Biol.*, **33**, 307-318 (1967).
 - 32) Nakane, P. K.: Recent progress in the peroxidase-labeled antibody method. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **254**, 203-211 (1975).
 - 33) Rexed, B.: The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.*, **96**, 415-496 (1952).
 - 34) Goodman, C. S., Bastiani, M. J., Doe, C. Q., du Lac, S., Helfand, S. L., Kuwada, J. Y. & Thomas, J. B.: Cell recognition during neuronal development. *Science*, **225**, 1271-1279 (1984).
 - 35) Moos, M., Take, R., Scherer, H., Teplow, D., Fruh, K. & Schachner, M.: Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature*, **334**, 701-703 (1988).
 - 36) Brummendorf, T., Wolff, J. M., Frank, R. & Rathjen, F. G.: Neural cell recognition molecule F11: homology with fibronectin type III and immunoglobulin type C domains. *Neuron*, **2**, 1351-1361 (1989).
 - 37) Rathjen, F. G., Wolff, J. M., Chang, S., Bonhoeffer, F. & Raper, J. A.: Neurofascin: A novel chick cell-surface glycoprotein involved in neurite-neurite interactions. *Cell*, **51**, 841-849 (1987).
 - 38) Chang, S., Rathjen, F. G. & Raper, J. A.: Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoproteins. *J. Cell Biol.*, **104**, 355-362 (1987).
 - 39) Hunt, S. P., Mantyh, P. W. & Priestley, J. V.: The organization of biochemically characterized sensory neurons. *In* S. A. Scott (ed.), *Sensory Neurons*, 1st ed., p60-76, Oxford University Press, Oxford, 1992.
 - 40) Fyffe, R. E. W.: Laminar organization of primary afferent termination in the mammalian spinal cord. *In* S. A. Scott (ed.), *Sensory Neurons*, 1st ed., p131-139, Oxford University Press, Oxford, 1992.
 - 41) Light, A. R., Trevino, D. L. & Perl, E. R.: Morphological features of functionally defined neurons in the marginal zone and substantia gelatinosa of the spinal dorsal

horn. *J. Comp. Neurol.*, **186**, 151-172 (1979).

42) Martini, R. & Schachner, M.: Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecule (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve. *J. Cell Biol.*, **103**, 2439-2448 (1986).

43) Bartsch, U., Kirchhoff, F. & Schachner, M.: Immunohistological localization of the adhesion molecules L1, N-CAM, and MAG in the developing and adult optic nerve of mice. *J. Comp. Neurol.*, **284**, 451-462 (1989).

44) Joosten, E. A. J., Gribnau, A. A. M. & Gorgels, T. G. M. F.: Immunoelectron microscopic localization of cell adhesion molecule L1 in developing rat pyramidal tract. *Neuroscience*, **38**, 675-686 (1990).

45) Joosten, E. A. J.: Immuno-electronmicroscopic visualization of cell adhesion molecule L1 in adult rat pyramidal tract: localization on neuronal and oligodendrocytic processes. *Brain Res.*, **546**, 155-160 (1991).

46) Snyder, R.: The organization of the dorsal root entry zone in cats and monkey. *J. Comp. Neurol.*, **174**, 47-70 (1977).

47) Seilheimer, B. & Schachner, M.: Studies of adhesion molecules mediating interactions between cells of peripheral nervous system indicate a major role for L1 in mediating sensory neuron growth on Schwann cells in culture. *J. Cell Biol.*, **107**, 341-351 (1988).

48) Bixby, J. L., Lilien, J. & Reichardt, L. F.: Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro. *J. Cell Biol.*, **107**, 353-362 (1988).

49) Wood, P. M., Schachner, M. & Bunge, R. P.: Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J. Neurosci.*, **10**, 3635-3645 (1990).

50) D'Urso, D., Brophy, P. J., Staugaitis, S. M., Gillespie, C. S., Frey, A. B., Stempak, J. G. & Colman, D. R.: Protein zero of peripheral nerve myelin: Biosynthesis, membrane insertion, and evidence for homophilic interaction. *Neuron*, **2**, 449-460 (1990).

51) Inuzuka, H., Redies, C. & Takeichi, M.: Differential expression of R- and N-cadherin in neural and mesodermal tissues during early chicken development. *Development*, **113**, 959-967 (1991).

Immunoelectron Microscopic Localization of E-cadherin in Mouse Sensory Neurons: Role of E-cadherin in Axonal Fasciculation Naoyuki Uchiyama, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **102**, 39—48 (1993)

Key words E-cadherin, fasciculation, immunoelectron microscopy, mouse sensory neuron, unmyelinated fiber

Abstract

The localization of the cell adhesion molecule, E-cadherin, was studied immunohistochemically at the light and electron microscopic levels in the spinal nerve of mice. For electron microscopy, immunolabeling was performed by pre-embedding staining procedures. In dorsal roots and lamina II of spinal cords, E-cadherin was expressed in a particular subset of fasciculating unmyelinated fibers at all ages studied from postnatal day 2 through adulthood, although the axolemma of myelinated fibers was E-cadherin-negative at internodes. Myelinating Schwann cells were E-cadherin-positive at the cell surface, outer mesaxon, and finger-like processes attached to nodes of Ranvier. Non-myelinating Schwann cells were E-cadherin-positive at contact sites with unmyelinated fibers as well as at the cell surface. In dorsal root ganglia, E-cadherin was seen at contact sites not only between satellite cells but also between satellite cells and neurons. These results suggest that E-cadherin plays an important role in the selective fasciculation of sensory neuronal fibers originated from dorsal root ganglia and the maintenance of peripheral nerve structure including myelin formation.